胰岛素样生长因子结合蛋白 3 定量测定试剂盒（酶联免疫法）使用说明书

【产品名称】

通用名称：胰岛素样生长因子结合蛋白 3 定量测定试剂盒（酶联免疫法）

【包装规格】

96 人份/盒

【预期用途】

本产品仅供体外诊断。IDS IGFBP-3 ELISA 试剂盒是双位点酶联免疫吸附试验分析法检测人类血清胰岛素样生长因子结合蛋白 3。IGFBP-3 只作为帮助评估生长紊乱的检测项目。

【简介概述】

胰岛素样生长因子(IGF-I、IGF-II)是与细胞生长和新陈代谢有关的肽。在循环中，>95%的 IGF-I 和 IGF-II 结合到 6 种特异性的 IGF-结合蛋白(IGFBP-1 到 6)。IGFBPs 通过阻止 IGF 结合到细胞表面的受体以调节 IGFS 的活性。另外，一些 IGFBPs 可能有不受 IGF 制约的活性。

在这些 IGFBPs 中含量最丰富的是 IGFBP-3，在正常血清中的 IGF-结合蛋白含量>75%。 IGFBP-3 有 264 个氨基酸的酸糖基化蛋白(nonglycosylated MW 29kDA) ，包括 IGF 和不耐酸蛋白亚单位在循环中是最主要的高 MW 三重混合物。

IGFBP-3 在循环中的浓度是根据生长激素（GH）蛋白酶和年龄的变化、青春期和性变。除此之外，蛋白酶的活性能调节 IGFBP-3。分解蛋白活性在怀孕妇女的血清是显著的高。IGFBP-3 的水平在 GH 不足时是低的和在 GH 分泌过多时异常。测量血清的 IGFBP-3 是对评估和 GH 相关的紊乱的治疗监测是公认的。

【检验原理】

IDS IGFBP-3 ELISA 试剂盒是一个纯化的单克隆绵抗-IGFBP-3 抗体包被在聚苯乙烯微量孔的内表面（固相或抗体捕获）。标准，稀释质控和稀释病人样本然后与生物素多克隆兔抗-IGFBP-3 在抗体包被的微量孔中孵育并震荡，在室温下放置两个小时。清洗微量孔和加入酶标生物素的复合物（辣根过氧化物酶）。进一步清洗后，加入单一的成份的显色底物（四甲基联苯胺）形成颜色。终止混合物的反应，吸光度在微量板读数仪上读取，颜色的强度与样本中 IGFBP-3 的数量成正比关系。

【主要组成成份】

1. **CAL | 0– 标准 O/样本稀释 (REF AC-1901A):**
   包含BSA、稳定剂和0.05%叠氧化钠的磷酸盐缓冲液，每瓶50 mL。
2. **CAL | 1–CAL | 5 - 标准 (REF AC-1901B - AC-1901F):**
   包含重组的IGFBP-3、BSA、稳定剂和0.05%叠氧化钠的磷酸盐缓冲液。每瓶1 mL，每盒5瓶。
3. **MICROPLAT – 抗体包被板 (REF AC-1902W):**
   微量板被羊抗IGFBP-3单克隆抗体连接到聚苯乙烯微量孔的内部表面，8X12板条孔带干燥剂。
4. **AB BIOTIN – 抗体生物素 (REF AC-1903):**
   磷酸盐缓冲液包含连接生素素的兔抗IGFBP-3多克隆抗体，蛋白，酶稳定剂和0.05%防腐剂。每瓶12 mL。
5. **ENZYMCONJ – 酶结合物 (REF AC-1904):**
   磷酸盐缓冲液包含抗生物素蛋白的辣根过氧化物酶，蛋白，酶稳定剂和防腐剂。每瓶24 mL。
6. **CTRL 1-2– 质控 (REF AC-1905A - AC-1905B):**
   人类血清干粉包含IGFBP-3。每瓶1 mL，每盒2瓶。
7. **HCL – 终止液 (REF AC-STOP):**
   0.5M盐酸，每瓶14 mL。
8. **TMB – TMB底物 (REF AC-TMB):**
   专用的液体形式四甲基联苯胺（TMB）和过氧化氢，每瓶24 mL。
9. **WASHBUF 20x – 浓缩冲洗缓冲液 (REF AC-WASHL):**
   磷酸盐缓冲液包含吐温，每瓶50 mL。
10. 带有粘性的封板纸

每瓶4 瓶。

【储存条件及有效期】

如果试剂的保存是有效的，所有试剂可保存到有效期，收到试剂后放在2-8℃中保存。复溶的质控CTRL在-20°C可保存4星期。

未使用的抗体包被板MICROPLAT条必须放回有干燥剂的铝箔带中。在2-8℃下保存4个星期。洗液可在室温下保存8个星期。

试剂效价可能降低的迹象

1. 在任何一个试剂中有异常微粒子出现。
2. 最高吸光度下降。
3. 正常姿态的曲线倾斜度变化。

【适用仪器】

适用于具有 450nm、650nm 波长的所有全自动、半自动酶标仪。

【样本要求】

分析可使用血清或血浆标本。标本收集之后应该尽快地分离，长期储藏需-20°C，避免样品反复的冻融。

【检验方法】

试剂准备

标准液 CAL：质控CTRL以冻干品形式提供。每瓶加1 mL蒸馏或去离子水复溶。将盖子重新盖上在室温下静置10-15分钟，反复颠倒几次确保复溶完全。

如果质控CTRL使用超过一次，要快速冰冻保存(-20°C)（复溶后的30分钟内）。重新再使用质控CTRL时，在室温下解冻，并混匀并且在解冻后的15分钟内使用。

冲洗液：每瓶浓缩冲洗液WASHBUF 20x 加950 mL蒸馏或去离子水并且混匀，储存在室温。

所有其他试剂直接使用。所有试剂使用之前应该回复至室温。试剂使用之前重复倒置混合混匀。

需要的但没有提供的物品

1. 可任意使用的12X75mm的塑料试管。
2. 能精确分配10μL和50μL的加样器。
3. 可重复分配1mL的加样器，如Eppendorf Multipipette 4780或相类似的。
4. 精确的多道加样器能分配100μL和200μL。
5. 旋涡混合器
6. 全自动洗板机 (可选配)。
7. 微量板读数仪和数据处理系统。

操作程序

按"试剂准备"里所描述的那样复溶或准备试剂。

1. 准确有标签的塑料试管，每个质控CTRL和样本各一管。

注意：定标液不需要稀释并且直接可用。

2. 每个质控CTRL和样本各加**10 μL**到相应的试管中。
3. 加**1.0 mL** 的标准0/样本稀释液CAL | 0到每个试管中。旋涡混合所有试管。样本现在可以用于分析。
4. 加入**50 μL**已准确好的每个标准CAL，稀释的质控CTRL和稀释的样本到相应的抗体包被的微量孔中MICROPLAT中，双份检测。

注意：这些加入必需在10分钟内完成，以减少随机误差。

5. 使用多道加样枪加入**100 μL**的抗体生物素AB-BIOTIN到所有微量孔中。
6. 用带有粘性的封板纸盖好微量板，并在带槽的微板震荡器（500-700rpm）中18-25°C下孵育2小时。
7. 用冲洗液清洗所有微量孔三次：

a) 全自动洗板机：设定洗板机每个孔至少**300 μL**的冲洗量，加满和吸干进行3次循环。

b) 手工冲洗：轻轻的颠倒板架使孔内的液体倒出，加入**250 μL**的冲洗缓冲液到所有的孔中，倒出并重复二次。

在进行下一步操作时，将微量板翻转在滤纸上轻打，以确保吸干微量孔内多余的冲洗液。

8. 用多道加样器在所有微量孔加入**200 μL**的酶结合物ENZYMCONJ到所有微量孔中。

9．带有粘性的封板纸盖好微量板，并在18-25°C下孵育2小时30分钟。

10．重复第7个步骤。

18-25°C下孵育2小时30分钟。

注意：TMB 底物容易受到污染。仅能从瓶子中移出分析所需的用量，不使用的TMB 底物丢掉，不能再倒回瓶子中。

12．用多道加样器在所有微量孔加入**100 μL**的终止液HCL。

13．在加入终止液的30分钟内使用微孔板读数仪在405 nm（参考波长为650 nm）下测量所有孔的吸光度。

标准

IGFBP-3 试剂盒的标准是在很多数量单位的基础上较准并且是重组的人类IGFBP-3糖基化蛋白预分析的。标准已经进行预稀释1/101以致病人的样本可以直接读取能从标准曲线上读取结果而不需要进行较正。

质量控制

质控规则使用的质控样本要求几种水平的分析物，以确保每天的结果在可接受的范围内。提供两套质控。为了能正确评估IDS分析推荐所有实验室包括每次适当分析部分的内部混合血浆，除试剂提供的质控外。质控应作为未知物进行检测。质量控制图应按照测试的结果进行绘画。

【参考值（参考范围）】

以下的范围是由IDS IGFBP-3 ELISA 试剂进行测定并且仅提供参考。每个实验室必须建立自己地区人群的范围值。

年龄（岁数）	数目	中间值 **ng/mL**	**95%**区间 **ng/mL**
0-2	7	517	365 -1294
3-4	4	1915	1366 -2632
5-6	9	1257	878 -2026
7-8	5	1803	1416 -2574
9-10	27	1750	1089 -3209
11-12	27	2423	1149 -3117
13-14	45	2285	921 -3222
15-16	47	2155	1569 -3000
17-18	54	2116	1110 -2857
19-20	49	2161	1513 -3578
21-30	45	2681	1627-5619
31-40	44	3001	1700 -5205
41-50	75	2481	1284 -4330
51-60	173	2335	1448 -3567
61-70	43	2201	1195 -3714
71-80	5	1673	1094 -3177

【检验结果的解释】

结果计算

计算每个标准，质控和未知样本的吸光度的平均值。准备lin-log图纸将每个标准的吸光度均值绘制在纵座标与IGFBP-3浓度值在横座标的对数相关图。从标准曲线图中读出质控与未知样本的ng/mL结果。

对于评估较低浓度值我们建议绘制与低浓度标准值对应浓度的线性图（linear-linear）。未知样本的结果直接在曲线中读取。

选择减少数据的方法可能被使用，但是操作人员必须选择适合数据的曲线和给出可接受的结果。推荐曲线要平整光滑。

IDS结果计算使用MultiCalc (PerkinElmer)数据约简软件，绘制吸光度VS Log浓度的适合曲线图。

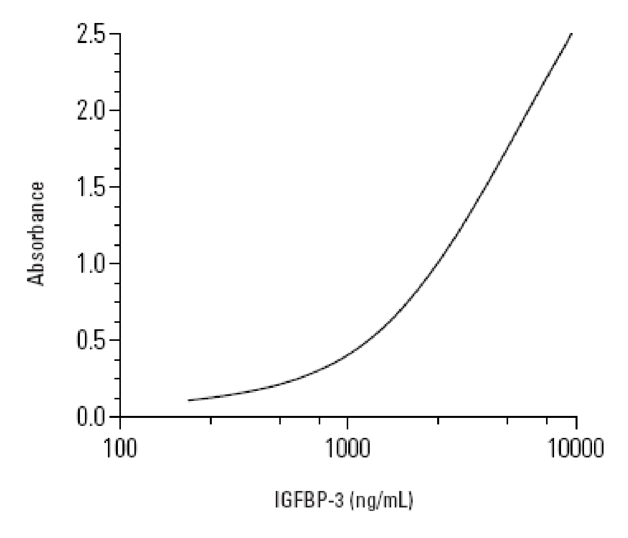
分析报告的范围是200 – 10000 ng/mL。任何结果低于最低的标准200 ng/mL时，应作用一个推断值并且以“低于200 ng/mL”来报告。

样本数据分析：

这些数据仅用于作为例子介绍，不能用于任何样本结果的计算。

孔	描绘	吸光度	平均吸光度	结果**U/L**
A1, A2	标准0 (0 ng/mL)	0.058 0.062	0.060	
B1, B2	标准1 (200 ng/mL)	0.113 0.113	0.113	
C1, C2	标准2 (500 ng/mL)	0.222 0.211	0.217	
D1, D2	标准3 (2000 ng/mL)	0.842 0.807	0.825	
E1, E2	标准4 (5000 ng/mL)	1.781 1.729	1.755	
F1, F2	标准5 (10000 ng/mL)	2.612 2.500	2.556	
G1, G2	样本1	0.536 0.514	0.525	1259
H1, H2	样本2	1.645 1.617	1.631	4499

典型的标准曲线：



【检验方法的局限性】

1． 样本包含的分析物浓度超过最高的标准液浓度时，样本要用Calibrator 0稀释后重做。

2． 在任何疾病诊断程序的结果必须连同病人的临床症状和医生取得的信息一同进行解释。

3． IGFBP-3有内生血清蛋白酶时会下降，蛋白分解在怀孕期间会显著升高。这个试剂盒不适用检测怀孕妇女的血清样本。

4． 在其它环境下评估蛋白酶活性和/或蛋白酶碎片，例如：慢性肾衰竭，糖尿病或肿瘤。这些个案是临床相关性中特别受到推荐的。

5． 以下物质是根据NCCLS EP7-A“临床化学的干扰测试：认可方针”进行测试，并且没有发现对IGFBP-3分析有干扰：

血红蛋白　　　　检测最高浓度为500 mg/dL

胆红素　　　检测最高浓度为20 mg/dL

脂类　　　　　检测最高浓度为3000 mg/dL（甘油三脂）

EDTA　　　　检测最高浓度为800 mg/dL

肝素　　　　　　　　检测最高浓度为800 mg/dL

6. IGFBP-3 曲线变曲的变化测试在50,000 ng/mL下进行，并且没有发现有任干扰效果。

【产品性能指标】

方法对比

IDS IGFBP-3 ELISA 与已知定量的检测IGFBP-3的双位点夹心ELISA分析方法进行比较，根据NCCLS EP-9A2 “方法学比较和使用病人样本基础评估”。134个样本，选择选择宽的IGFBP-3 [225-4035 ng/mL]范围，用两种方法同时分析。回归法进行分析比较数据：IDS = 0.41(x) + 122 (95% CI 的斜率和截距分别为0.37到0.45，和-66到309) 相关系数为(r) = 0.85

精密度

精密度的评估是根据NCCLS EP-5A2，“定量检测方法的精密度评估”。3个人类血清质控超过四倍分析37个分析天生成超过58个操作数据。这个分析由多个操作人员和多个批号的试剂完成。

质控	n	平均值 (ng/mL)	重复性		批内检测	
			SD	CV%	SD	CV%
1	60	1433	49	3.4	122	8.5
2	60	4904	280	5.7	544	11.1
3	60	6738	400	5.9	785	11.7

灵敏度

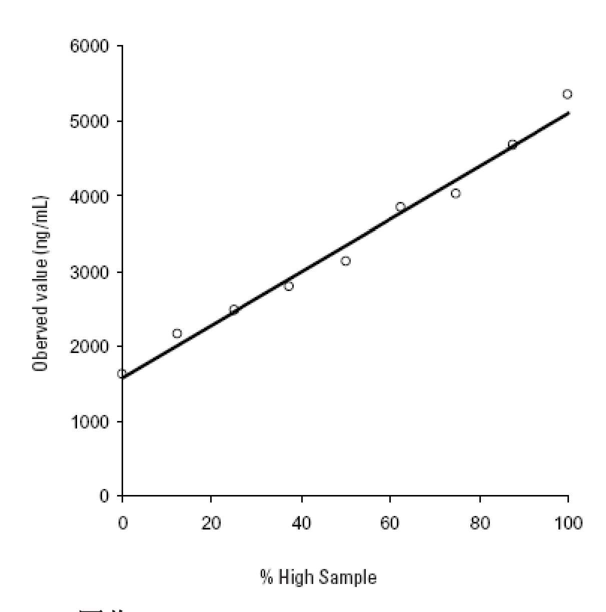
灵敏度是由20个零点标准液乘以2个标准差的平均值来决定的，校正后的相应浓度为137 ng/mL。

线性

线性的分析是由稀释的样本与“0”标准液进行分析。

线性分析是根据NCCLS的EP-6A“评估线性的定量测量程序：统计学方法”。双份检测样本中包含不同浓度的IGFBP-3。结果的平均值浓度与预期的结果相比较。由高浓度的病人样本和低浓度的病人样本预先稀释作为分析样本。

预期的浓度 ng/mL	测量的浓度 ng/mL	变异	
		ng/mL	%
1566	1621	55	4%
2009	2163	154	8%
2451	2476	25	1%
2894	2784	-110	-4%
3336	3119	-217	-7%
3779	3832	54	1%
4221	4012	-209	-5%
4664	4670	6	0%
5106	5349	243	5%



回收

回收试验是在样本中加入IGFBP-3作为分析。

样本浓度(ng/mL)	IGF-1加入(ng/mL)	测量(ng/mL)	回收 (ng/mL)	回收(%)
1072	1000	1955	883	88
1025	1000	2000	975	97
1178	1000	2164	986	99
			平均	**99**

特异性

分析物	交叉反应
IGFBP-3	100%
Insulin(2,500IU/mL)	ND
IGF-I(100μg/mL)	ND
IGF-II(4μg/mL)	ND
IGFBP-1(10μg/mL)	ND
IGFBP-2(10μg/mL)	ND
IGFBP-4(10μg/mL)	ND
IGFBP-5(10μg/mL)	ND
IGFBP-6(10μg/mL)	ND

【注意事项】

IDS IGFBP-3 ELISA 分析方法仅用于研究使用，不能在人类或其它动物内使用。这产品必须严格按照试剂盒内附的说明书内所述的操作一致。如果不遵从使用说明的用法而产生废物导致出现任何的损失或损害(除法令所需要)，IDS公司将不负任何负责。

注意：试剂包含有动物成份物质。处理试剂时应将试剂作为有传染性的物质处理。

适当的预防和好的实验室操作习惯必须在试剂盒的保存，使用和处理时使用。处理试剂时应按当地的规定程序处理。

人类血清：质控CTRL

在这个产品中使用的人类物质已通过被FDA认可的分析方法检测HIV I & II& HBV& HCV，而且阴性的。没有测试能提供完全的保证传染性的因子不存在，所有试剂应该按照生物研究安全性水平2 处理；

叠氮化钠

试剂盒内的一些试剂包含作为防腐剂的叠氮化钠，它可与铝、铜或者黄铜铝制品形成高爆炸性的金属叠氮化物。在处理时，用大量的水冲以防止生成金属的叠氮化物。

四甲基联苯胺

TMB底物TMB含 3,3’,5,5’-四甲基联苯胺。

R21/22　　皮肤的接触或吞咽都是有害。

S36/37　　穿着保护适当的衣服和手套。

0.5M 盐酸

终止液HCL包含0.5M的盐酸。

R36/38　　刺激眼睛和皮肤；

S26　　如果接触到眼睛，马上用大量的水冲洗并且寻求医生建议；

S36/37　　穿着保护适当的衣服和手套。

【参考文献】

1. Badaru A, Wilson D. Alternatives to growth hormone stimulation testing in children. Trends Endocrinol Metab 2004, 15:252-258.
2. Bray I, Gunnell D, Holly JM, et al. Associations of childhood and adulthood height and the components of height with insulin-like growth factor (IGF) levels in adulthood: 65 year follow-up of the Boyd Orr cohort. J Clin Endocrinol Metab 2006, 91:1382-1389.
3. Cianfarani S, Liguori A, Germani D. IGF-I and IGFBP-3 in the management of childhood onset growth hormone defi ciency. Endocr Dev 2005, 9:66-75.
4. Hasegawa Y, Hasegawa T, Anzo M, et al: Clinical utility of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF binding protein-3 levels in the diagnosis of GH defi ciency (GHD) during childhood. Endocr J 1996, 43 Suppl: S1-S4.
5. Jensen RB, Jeppsen KA, Vielwerth S, et al: Insulinlike growth factor I (IGF-I) and IGF-binding protein 3 as diagnostic markers of growth hormone defi ciency in infancy. Horm Res 2005, 63: 15-21.
6. Lofqvist C, Andersson E, Gelander L, et al: Reference values for insulin-like growth factorbinding protein-3 (IGFBP-3) and the ratio of insulin-like growth factor-I to IGFBP-3 throughout childhood and adolescence. J Clin Endocrinol Metab 2005, 90:1420-1427.

【生产企业】

生产者名称：英国 Immunodiagnostic Systems Limited(IDS Ltd)

生产者/生产场所地址：10 Didcot Way,Boldon　Business Park,Boldon,Tyne&Wear,NE35 9PD,UK

联系方式：+44 (0) 191 519 0660

传真：+44 (0) 191 519 0760

网址：www.idsltd.com

售后服务机构：北京荣志海达生物科技有限公司

地址：北京市海淀区永定路 88 号长银大厦 12 层 B12 室

电话：+86 10 58895646　　+86 20 32293178

传真：+86 10 58895611　　+86 20 32293177

电子邮箱：info@rz-biotech.com

网址：www.rz-biotech.com

【医疗器械生产企业许可证编号】

【医疗器械注册证书编号】

【产品标准编号】

【说明书批准及修改日期】

仅供参考，请以原版英文说明书为准！